

THESIS

MUNCH

1966

**Versuche zur Isolierung
einer hämatopoetisch wirksamen
Substanz aus der Milz**

CARIN FEESER

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Prof. Dr. Adolf Butenandt

Versuche zur Isolierung einer hämatopoetisch
wirksamen Substanz aus der Milz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Carin Feeser
aus
Haßloch/Pfalz

1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ruhenstroth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Butenandt

Dekan: Prof. Dr. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 10.5.1966.

Ich danke Herrn Professor Dr. A. Butenandt
und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth für
die gestellte Aufgabe und für die großzügi-
ge Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
Anlaß für die Arbeit und Fragestellung	
II. Voraussetzungen	3
A) Theorie der Zellelektrophorese und ihre Aussagemöglichkeiten	
B) Arbeiten über die elektrophoretische Beweg- lichkeit von elektrophoretisch schnellen Leukozyten	10
III. Methoden	11
A) Das verwendete zellelektrophoretische System	11
B) Präparation des Meßgutes	15
C) Die Meßtechnik	17
D) Der biologische Test	19
IV. Versuche zum Vorkommen der Fraktion elektro- phoretisch schneller Leukozyten	22
1) Auftreten von elektrophoretisch schnellen Leukozyten nach Injektion von Lipopoly- sacchariden	22
a) Versuche mit Pyrifer	22
b) Versuche mit Pyrexal	22
c) Versuche mit Lipopolysacchariden aus Coli O 111	23
2) Veränderungen im Hämozytopherogramm beim Ascitestumor	23
3) Einfluß der Milz auf die Erhöhung der elektrophoretisch schnellen Leukozyten	23
a) Zellelektrophoretisches Ergebnis nach Ganzkörperbestrahlung	23
b) Zellelektrophoretisches Ergebnis nach Teilkörperbestrahlung	24
V. Anreicherung eines humoralen Faktors aus der Rindermilz, der das Auftreten der Fraktion elektrophoretisch schneller Leukozyten stimu- liert.	25

1) Herstellung des Rohhomogenats	25
2) Seine Eigenschaften	25
a) pH-Abhängigkeit	25
b) Druckdialysierbarkeit	26
c) Hitzeinaktivierbarkeit	26
d) Auftrennung an Sephadex G 25	26
e) Nachweis zum Ausschluß eines Kohlenhydrates	26
f) Fermentbehandlung	26
g) Speziesunspezifität	29
Weitere Reinigungsschritte des wirksamen Extraktes	30
1) Änderung der Extraktionsmethoden	30
2) Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie	31
Neuer Aufarbeitungsweg und Charakterisierung von Substanz F_D	35
1) Extraktion	35
2) Dünnschichtchromatographie	35
3) Spektren von Fraktion F_D	36
a) UV-Spektrum	
b) IR-Spektrum	
c) KMR-Spektrum	
4) Versuche zur Frage der Organspezifität des wirksamen Faktors	36
VI. Besprechung	37
VII. Zusammenfassung	44
VIII. Literaturverzeichnis	46

I. Einleitung

Unsere Kenntnisse über die Funktion der Milz sind noch sehr lückenhaft. Beim Säuger ist sie in wechselndem Anteil zugleich Blutbildungsstätte, Stoffwechsel- und Speicherorgan und als solche wahrscheinlich in viele Regulationen eingeschaltet; ihre Funktion in Abwehr und Inkretion ist teilweise noch immer unklar (1).

Schon 1916 vermutete Frank (2), daß der Milz inkretorische Funktionen zukämen: er machte die vermehrte Ausschüttung angeblicher Milzhormone und eine daraus resultierende Knochenmarkshemmung für bestimmte Formen der "Hypoleukie" oder "Aleukie" verantwortlich. Die Annahme einer solchen Beziehung zwischen Milz und Knochenmark wurde in der Folgezeit durch die therapeutischen Erfolge der Splenektomie bei bestimmten Bluterkrankungen, durch den modifizierten Verlauf der hämatologischen Reaktionen nach einer Ganzkörperbestrahlung splenektomierter Tiere und einer Reihe anderer Beobachtungen weiter unterbaut (3,4). Diese Beobachtung pathologischer Befunde läßt jedoch nicht ohne weiteres auf die physiologische Bedeutung der gesunden Milz schließen (5,6).

Uns interessierten vor allem die regulativen Funktionen der Milz innerhalb des hämatopoetischen Systems. Die relative Konstanz in den Konzentrationen der einzelnen Zellsysteme im Blut spricht dafür, daß diese jeweils durch Regelmechanismen aufrechterhalten werden. Für die Erythropoese konnte ein solcher Mechanismus (7) im letzten Jahrzehnt nachgewiesen werden; in den Regelkreis ist ein humorales Glied, das Erythropoetin (8), eingeschaltet. Unsere Kenntnis über die Regelung der Leukozyten und Thrombozyten-

konzentrationen im Blut ist dagegen sehr viel geringer, aber auch hier sprechen eine Reihe von Versuchen dafür, daß daran ein oder mehrere humorale Faktoren beteiligt sind. Ein Teil der Versuche spricht dafür, daß die Milz dabei eine Rolle spielt (9).

Bei der Reaktion des Organismus auf eine Ganzkörperbestrahlung mit energiereichen Strahlen spielt die Milz eine wesentliche Rolle: Die Regeneration des Knochenmarks und des peripheren Blutbildes erfolgt schneller, wenn die Milz während der Bestrahlung abgeschirmt (10) oder wenn nachher gesundes Milzgewebe implantiert wird (11), bzw. Milzzellen infundiert werden (12,13); Milzzellhomogenate sind ebenso wirksam (14,15). Man hat Extrakte aus Milzhomogenaten gewonnen, die die Überlebensrate erhöhen (16). Auch der Verlauf der Strahlenkrankheit wird durch Splenektomie verschieden beeinflusst (17,18). Diese und andere Befunde (19a,b) machen es wahrscheinlich, daß die Milz unter bestimmten Bedingungen sowohl fördernde als auch hemmende Wirkungen auf die Regeneration des Knochenmarks und des Blutbildes haben kann.

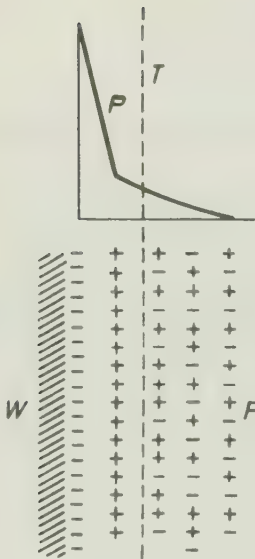
Ausgangspunkt für die Versuche waren die Befunde von Arnold, daß nach einer Ganzkörperbestrahlung im Hämozytopherogramm der Ratte elektrophoretisch schnelle Leukozyten mit einer Beweglichkeit nachweisbar sind, wie sie für eine der beiden elektrophoretisch faßbaren Fraktionen von Knochenmarkszellen typisch ist. Diese Zellfraktion wird nach Bestrahlung splenektomierter Tiere in deren Blut nicht gefunden (20). Ziel der Arbeit war es, weitere Bedingungen für das Auftreten dieser elektrophoretisch schnellen Leukozyten zu studieren.

II. Voraussetzungen

A) Die Theorie der Zellelektrophorese und ihre Aussage- möglichkeiten

Mit der Zellelektrophorese kann man die Geschwindigkeit von Zellen im elektrischen Feld bestimmen. Diese ist dem elektrischen Oberflächenpotential direkt proportional (21,22), das die Zellen nach einer Aufschwemmung in einem wässrigen Medium besitzen. Die Gesetzmäßigkeiten, denen dieses Potential gehorcht, wurden zunächst von Quinke, dann von Helmholtz und Gouy-Chapman aufgestellt. Die im folgenden kurz dargestellte Theorie entspricht der Modifikation nach Stern (23).

Befindet sich eine Zelle in einem wässrigen Medium, hat ihre Zellmembran ein bestimmtes stationäres, durch Dissoziation entstandenes Wandschichtenpotential φ_0 . An diese Grenzfläche werden aus dem umgebenden Medium Ionen z.T. fest adsorbiert; der Potentialabfall erfolgt linear von der Zellmembran ausgehend über die Schichtdicke $\int$ der fest adsorbierten Ionen (Helmholtz) (24). Von der Schichtdicke $\int$ der fest adsorbierten Ionen erstreckt sich die sogenannte diffuse Doppelschicht, die durch statistisch verteilte Raumladungen charakterisiert ist, in das umgebende Medium ähnlich einer Debye-Hückel'schen Ionenwolke; das Potential fällt hier exponentiell ab (Gouy-Chapmann) (Abb. 1). Die Potentialdifferenz zwischen der Wand einschließlich ihrer Schicht fest adsorbierter Ionen aus der Flüssigkeit gegenüber dem peripheren Ende des verschieblichen Teils der Doppelschicht wird als $\int$ -Potential bezeichnet (Abb. 2).



W = Wand
P = linearer
Potentialabfall
T = Trennungsschicht
F = Flüssigkeit

Abb. 1:
Diffuse Doppelschicht

Bei der Dissoziation der Oberflächengruppen von Säugerzellen im wässrigen Medium treten mehr negative als positive Ladungen auf, so daß das Wandschichtenpotential negativ ist; bei Spirochätenarten, Trypanosomen und Siphonulus-Leukozyten (25) wurden auch positive } -Potentiale gemessen.

Die Säugerzellen bewegen sich bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode mit einer Geschwindigkeit, die der Höhe des } -Potentials direkt proportional ist. Diese Bewegung materieller Teilchen durch strömende Elektrizität wird Elektrophorese genannt (Quinke) (26). Das } -Potential heißt deshalb auch "elektrokinetisches Potential".

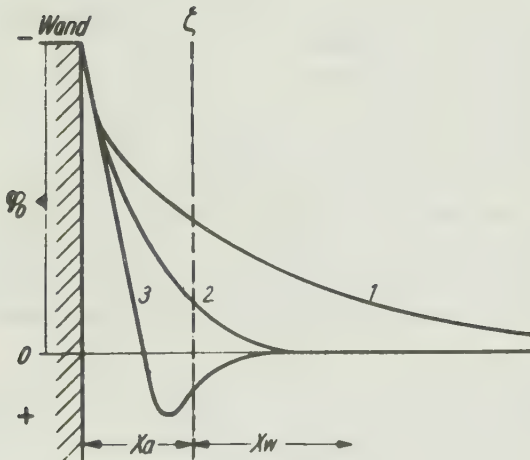


Abb. 2: Potentialverlauf in der Doppelschicht

1. Bei niedriger Ionenstärke
2. Bei hoher Ionenstärke
3. Bei Adsorption grenzflächenaktiver Gegenionen

Schnittpunkt mit der ξ -Linie gibt die
-Potentiale; φ_0 Wandschichtenpotential;
 x_a Dicke der adhärrierenden Flüssigkeitshaut

Nur dieses wird bei Beobachtung mit dem Mikroskop, d.h. bei der Zellelektrophorese erfaßt. Das ξ -Potential nähert sich dann φ_0 , wenn sich die Doppelschicht der Ionen möglichst weit in das umgebende Medium erstreckt, d.h. je niedriger dessen Ionenstärke ist.

Auch an der Grenzfläche Glas/isotonischer Puffer der Elektrophoreseküvette besteht ein Potentialsprung und eine Sternsche Doppelschicht. Bei Anlegen einer Spannung entsteht deshalb eine sogenannte elektroosmotische Flüssigkeitsbewegung. Die Strömung des Puffers erfolgt an der Glaswand kathodisch, da diese auf Grund ihrer niedrigeren Dielektrizitätskonstante eine negative Ladung trägt (Coehtnsche Regel). Bei Anlegen eines äußeren Feldes bewegt sich die Flüssigkeitsschicht des Puffers mit konstanter Geschwindigkeit parallel zur Grenzfläche. Die Geschwindigkeit V_0 der elektroosmotischen Bewegung ist dem angelegten elektrischen Feld direkt proportional.

Helmholtz und später Smoluchowski (27) fanden für V_0 empirisch folgende Gleichung:

$$V_0 = \frac{\xi \cdot X \cdot f}{4\pi \cdot \eta_0}$$

Dabei bedeutet ξ das Zeta-Potential, X die Feldstärke, ϵ die Dielektrizitätskonstante des Aufschwemmungsmediums und η_0 der Koeffizient der inneren Reibung.

Wird die tatsächlich gemessene Geschwindigkeit v auf die Feldstärke l bezogen, so heißt sie elektrophoretische Beweglichkeit b . Dafür gilt:

$$b \sim \frac{V_0}{X} \quad \text{oder} \quad b \sim \frac{\xi \cdot f}{4\pi \cdot \eta_0}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen (μ/sec) und die Feldstärke (V/cm) des Aufschwemmungspuffers in der Elektrophoreseküvette sind einfach zugängliche Größen; daraus ergibt sich also die elektrophoretische Zellbeweglichkeit in ($\frac{\mu/\text{sec}}{\text{V}/\text{cm}}$) bzw. $10^{-4}(\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1})$.

Für die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit müssen übersichtliche Strömungsverhältnisse vorhanden sein. Smoluchowski hat ein geeignetes geschlossenes Kammer-

system angegeben, bei dem sich Tiefe zu Breite wie 1 zu 20 verhalten. Die elektroosmotische Flüssigkeitsströmung ist darin gezwungen, in der Mitte umzukehren; dabei treten zwei den Breitseiten parallele Ebenen, die stationären Ebenen, auf, in denen die Flüssigkeitsströmung null ist; (Abb. 3), sie befinden sich in etwa $1/5$ und $4/5$ der Kammertiefe. Die Zellen bewegen sich hier mit ihrer wahren elektrophoretischen Geschwindigkeit.



Abb. 3: Schematischer Längsschnitt durch ein Zellelektrophoresesystem (Modell Abramson).
 Kreislauf $\rightarrow \rightarrow$ der wäßrigen Aufschwemmungsflüssigkeit nach Anlegen eines elektrischen Feldes. ---- Stationäre Ebenen (nach Smoluchowski).

Der mathematische Ausdruck für die Beziehung zwischen elektrophoretischer Zellbeweglichkeit und Kammertiefe ist in diesem Meßsystem eine Parabel; dabei wird die Zellbeweglichkeit auf der Abszisse und die Kammertiefe auf der Ordinate aufgetragen. Jeder Punkt auf der Parabel ist die Summe der konstanten elektrophoretischen Beweglichkeit und der variablen Geschwindigkeit des Puffers in diesem Punkt. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Zellen kann also durch die Messung in einer der berechneten stationären Ebenen, aber auch durch Bestimmung des Flächenintegrals der Strömungsparabel bestimmt werden (Abb. 4).

Da die Wanderungsgeschwindigkeit für alle bisher untersuchten Zellarten typisch ist, kann man damit Zellen charakterisieren (22,28). Die Methode der Zellelektrophorese wurde ursprünglich in der Bakteriologie, Virologie und

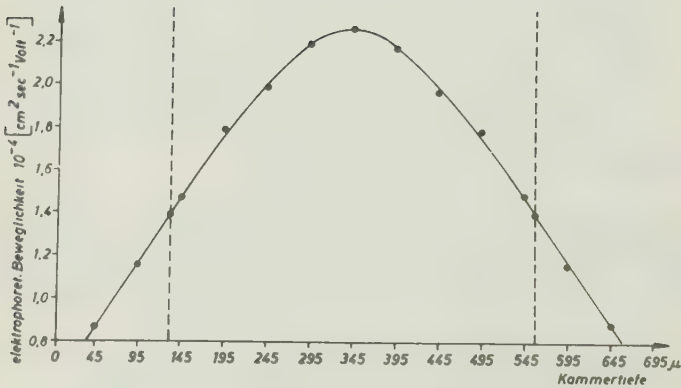


Abb. 4: Strömungsparabel der elektrophoretischen Beweglichkeit von Rattenerthrozyten über die Elektrophoresenkammertiefe, gemessen in Standardmichaelispuffer pH 6,9.

Erythrozytenforschung angewendet (29); ein wichtiges neues Anwendungsgebiet fand sie bei der Kennzeichnung von Membranstrukturen nach physikalischen und chemischen Eingriffen (30).

Neuerdings wurde die Brauchbarkeit der Methode in der klinischen Diagnostik untersucht (31). Bei den Blutzellen des gesunden Menschen wurden drei Zellgruppen mit verschiedener elektrophoretischer Beweglichkeit gefunden, die in sogenannten Hämozytopherogrammen wiedergegeben werden (32). Bei dieser Darstellung wird auf der Abszisse die elektrophoretische Beweglichkeit und auf der Ordinate die relative Zahl der gemessenen Zellen wiedergegeben; der Fußpunkt der Höhe der Dreiecke stellt den jeweiligen Mittelwert der elektrophoretischen Beweglichkeit der einzelnen Zellpopulationen und die Basen

der Dreiecke die Streuung um den betreffenden Mittelwert dar. Im Hämozytopherogramm entspricht die Verteilung der Zellen nicht der im Blut, da es bei der Präparation der Zellen zu einer Verschiebung der ursprünglichen Mengenverhältnisse kommen kann.

Im Hämozytopherogramm eines gesunden Menschen sind 3 Zellgruppen zu erkennen: die Zellen mit der schnellsten elektrophoretischen Beweglichkeit sind eindeutig Erythrozyten. Die beiden anderen Zellgruppen sind dagegen mikroskopisch nicht immer sicher zu charakterisieren (Abb. 5); ihre Differenzierung gelingt bei einer Auf-

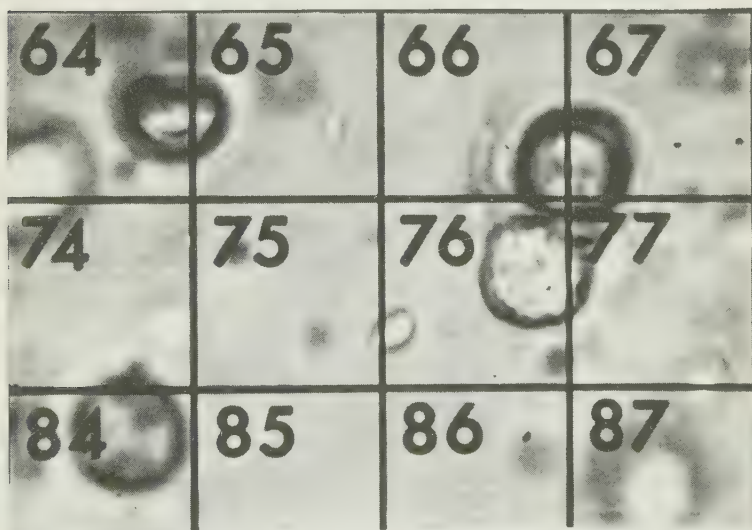


Abb. 5: Zellen wie man sie in der Aufschwemmung in Plasma in der Meßkammer bei 800-facher Vergrößerung sieht. Auf der Kante 64/65 ein Erythrozyt, auf der Kante 76/77 ein Granulozyt.

schwemmung der Zellen in isotonischer Pufferlösung besser als in ihrem eigenen Blutplasma. Wenn eine Unterscheidung möglich war, erwiesen sich die Zellen mit der mittelschnellen elektrophoretischen Beweglichkeit immer als Lymphozyten und die mit der langsamen Beweglichkeit als Granulozyten. Auch aus pathologischen Abweichungen ergab sich die genannte Zuordnung.

B) Arbeiten über die elektrophoretische Beweglichkeit von schnellen Leukozyten

Ausgangspunkt für die Versuche waren die zellelektrophoretischen Befunde, bei denen sich im Hämozytopherogramm sogenannte "schnelle Leukozyten" zeigten. Der Block der elektrophoretisch schnell wandernden Leukozyten wurde zunächst im menschlichen Hämozytopherogramm bei akuten Entzündungen gefunden (32); später fand Arnold (33) ein solches von der Norm abweichendes Hämozytopherogramm bei Tieren mit folgenden Tumorformen:

- a) bei soliden Tumoren: Shay-Leukom, Graffi-Leukom, Plasmozytom der Maus,
- b) bei dem in Aszitesform wachsenden malignen Ratten-Lebertumor nach Zajdela (47).

Zuletzt wurde die Fraktion im Blut von Ratten gefunden, die einer Röntgenganzkörperbestrahlung unterworfen worden waren (20). Auffallend war dabei, daß die Veränderungen nach Splenektomie und einer darauf folgenden Röntgenganzkörperbestrahlung nicht mehr beobachtet wurden.

III. Methoden

A) Das verwendete zellelektrophoretische System

In der Literatur wurden mehrere verschiedenartige Anordnungen zellelektrophoretischer Meßgeräte beschrieben (34-40). Nachfolgend wird das verwendete Meßsystem erklärt, das im Arbeitskreis Ruhenstroth-Bauer entwickelt wurde (41) (Abb. 6).

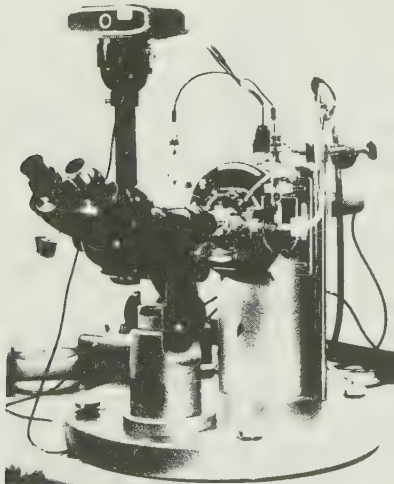


Abb. 6: Gesamtansicht des Zeiss'schen Meßgerätes, das im Arbeitskreis Ruhenstroth-Bauer entwickelt wurde. (Copyright Labor Dr. Derlath).

1) Die Meßkammer

Der wichtigste Teil des Zytopherometers ist die Meßkammer. Es ist eine rektanguläre Glasküvette aus Duran-50-Glas mit den ungefähren Abmessungen 32 x 0,9 x 14 mm. An die eigentliche Meßküvette schließen sich trichterartige, platte Übergangsräume aus demselben Glasmaterial an, die in Glasröhren von 0,4 cm Durchmesser auslaufen. Der Übergang von der Elektrophoresekammer in die Einfüllrohre muß möglichst kontinuierlich sein, um keine die endosmotische Flüssigkeitsbewegung störende Strömung zu verursachen. Die Anordnung der Kammer im Raum ist vertikal-waagrecht.

2) Die Elektroden (Abb. 7)

Das Elektrodensystem besteht aus dem Elektrodengefäß (Bild 7 a), dem Zwischenstück (Bild 7 b) und dem Zweiwegkupplungsstück (Bild 7 c). Parallele Schliffe an den einander jeweils zugekehrten Seiten der drei Elektrodenteile sowie zwei Federn ermöglichen beim zusammengefügt System eine dichte Verbindung.

In das Elektrodengefäß (a) werden eine Gelatineplombe, eine Gipsplombe und eine CuSO_4 -Lösung, in die die Kupferelektrode eintaucht, gebracht.

Die Gipsplombe muß nach 3-4 Wochen erneuert werden. - Die Gelatinelösung wird in heißem Zustand in den unteren, engen Teil des Elektrodengefäßes unter Vermeidung von Luftblasenbildung eingegossen. Der weite Teil des Elektrodengefäßes wird mit einer gesättigten CuSO_4 -Lösung gefüllt und ein Gummistopfen mit einer hindurchgeführten Kupferstabelektrode aufgesetzt. Membranfilter (Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen, Ultracellafilter, Durchlaufstufe feinst) werden auf das enge Ende des Elektrodengefäßes gelegt und das Zwischenstück so daraufgesetzt, daß dessen Glasfrittenabschluß nach außen zeigt. Auf dieses Ende wird wieder eine der oben

genannten Membranen gelegt und das Zweiwegkuppelungsstück daraufgesetzt. Zuletzt werden die 3 Teile mittels der 2 Federn fest verbunden. Mit kurzen Silikonkautschukstückchen wird eine möglichst enge Verbindung zwischen den Meßkammerenden und den inneren Enden der Zweiwegkuppelungsstücke hergestellt. Das äußere Ende des rechten Zweiwegkuppelungsstückes wird über einen Silikonkautschukschlauch mit dem Einfülltrichter, das äußere Ende des linken Zweiwegkuppelungsstückes mit einer in den Abbildungen nicht dargestellten Absaugflasche verbunden.

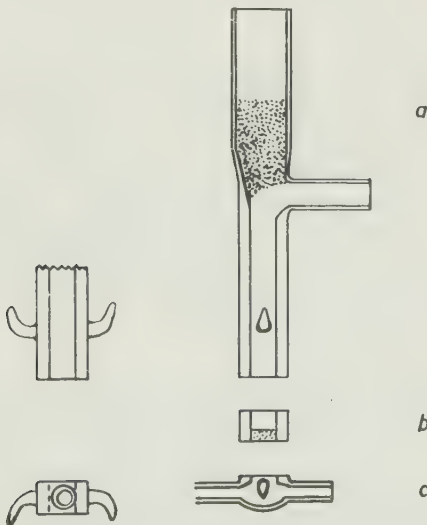


Abb. 7: Schematische Zeichnung der Elektrodenbestandteile
a = Elektrodengefäß, b = Zwischenstück,
c = Zweiwegkuppelungsstück

3) Die Kühlvorrichtung

Da Temperaturveränderungen die Zellwanderungsgeschwindigkeit beeinflussen, wurde von Fuhrmann et al. (42) ein geschlossenes Kühlgehäuse um die Kammer konstruiert. Es ist ein Quader von $3 \times 5 \times 10 \text{ cm}^2$ aus Plexiglas, in den die Kammer streng symmetrisch eingebaut ist. Die Rückwand des Gehäuses ist auf dem Mikroskoptisch festgeschraubt; die Vorderwand besteht aus einer wasserfesten Plastikmembran, in die zentral das Immersionsobjektiv des Mikroskopes eingebaut ist. Die Temperatur des durchfliessenden Wassers wurde durch einen Thermostaten konstant auf 23° gehalten.

4) Optische Einrichtungen

Die Zellsuspension in der Kammer wird mit einem Binokular-Mikroskop von Zeiss mit 800-facher Vergrößerung beobachtet. Die vertikal-waagrechte Anordnung der Meßkammer bedingt eine senkrechte Stellung des Mikroskoptisches. Der Strahlengang ist infolgedessen horizontal. In ein Okular ist ein Meßgitter mit einer bestimmten Gitterkonstante eingebaut, das gestattet, die Zellen bei ihrer Wanderung auf bekannten Wegstrecken zu beobachten.

5) Elektrische Einrichtungen

Ein Gleichrichtergerät dient als Stromquelle; bei allen unseren Versuchen lag die Stromstärke bei 5 mA. In den Stromkreis ist ein Duostat der Firma Beckman geschaltet, der die notwendigen konstanten Strombedingungen gewährleistet. Ein Kippschalter am Ampèremeter ermöglicht in einfacher Weise ein Umpolen ohne Zwischenschalten der Null-Stellung.

B) Präparation des Meßgutes

Von 6-8 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten wurde aus der Bauchorta in Äthernarkose etwa 4-5 ml Blut entnommen, das mit 0,1 ml Heparin (Vetren) ungerinnbar gemacht wurde. Anschliessend wurde es mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 3:2 verdünnt und zur Anreicherung der Leukozyten in ein Präparationsgefäß gegeben. Hierfür wurde in den in IV C beschriebenen Versuchen eine von M. Prätorius (München) angegebene Apparatur (Abb. 8) verwendet.

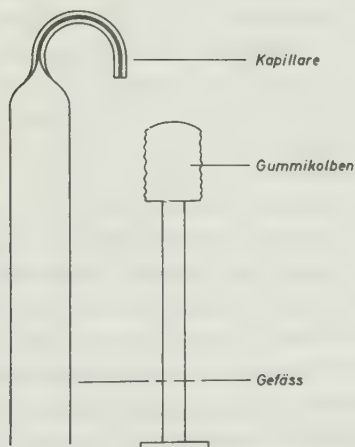


Abb. 8: Präparationsgefäß für Leukozyten
(M. Prätorius, München)

Das Gefäß besteht aus einem Glasröhrchen von 10 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser, das auf einer Seite trichterförmig kontinuierlich in eine zum Halbkreis gebogene Kapillare von 0,4 mm Durchmesser übergeht. Die andere Seite ist durch einen Gummikolben verschließbar, in den ein Gewinde eingebohrt ist, so daß ein Stempel von einer Kunststoffspritze hineingeschraubt werden kann. Das Gefäß wird möglichst ganz gefüllt und mit dem Stopfen verschlossen, der mit Vaseline vorher jeweils gefettet wird. Die Blut-Kochsalz-Lösung wird darin 15 Min. bei 400xg und 23° zentrifugiert. Man erhält so eine klare Plasma-Kochsalzlösung-Schicht ohne Zellen, eine gelbweiße Leukozytenschicht und als unterstes den Erythrozytenkuchen. Der Stempel wird jetzt eingeschraubt, der Kolben langsam hochgedrückt und von der Kapillare tropfenweise das Plasma, die Leukozyten und 1-2 Tropfen Erythrozytenaufschwemmung abgefangen. Man erhält so eine Suspension von 4 ml, die gerade zur Kammerfüllung ausreicht. Von der Blutentnahme bis zur Meßbereitschaft vergehen etwa 30 Min.

Bei den in IV A und IV B beschriebenen Versuchen wurde eine Apparatur verwendet, die einer Modifikation (43) der ursprünglich von Maupin und Chary angegebenen Methode entspricht. Der wesentliche Unterschied zu der oben beschriebenen Apparatur besteht darin, daß man den Druck, durch den die Plasma-Blutkuchensäule in dem Präparationsgefäß hochgeschoben wird, durch Zutropfen von Quecksilber erzeugt. Ein kontinuierliches Abtropfen des Plasmas ist nur möglich, wenn das System Quecksilberhülse-Präparationsgefäß-Kapillare luftdicht ist. Da man den Kapillarschliff nur mit Hilfe von Federn und Vaseline-schmierung luftdicht aufsetzen kann, ist diese Bedingung nur schwer einzuhalten.

Entnommenes Blut sollte nicht länger als 3 Stunden stehen, da dann die Zahl der Leukozyten mit der erhöhten Oberflä-

chenladung stark vermindert sind, bzw. im Hämozytopherogramm nicht mehr gefunden werden. Auch die Zellsuspension soll bald gemessen werden, da die Zellen leicht verbacken. Aufbewahrung in der Kälte verfälscht ebenso die Ergebnisse.

C) Die Meßtechnik

Vor jeder Füllung muß die Kammer gut gereinigt werden. Zu Beginn einer Meßserie füllt man sie 10-15 Min. mit 90 %iger Ameisensäure und spült 30-60 Min. mit Wasser nach. Anschliessend werden Alkohol und Äther durch die Kammer gespült, dann wird diese trockengesaugt. Zwischen zwei Messungen muß mindestens 10 Min. gespült werden, um eine mögliche Bedeckung der Wände mit denaturierten Proteinfilmen zu beseitigen.

Die Blutzellen bleiben in der Plasma-Kochsalz-Mischung aufgeschwemmt, da diese ausreichend konstante Leitfähigkeits- und Viskositätsbedingungen bietet. Ihr spezifischer Widerstand beträgt $3,321 \Omega \text{ cm}$. Die Suspension wird in den Glas-trichter der Meßapparatur eingefüllt, nachdem vorher die Kammerachse etwa um 60° gedreht wurde. Dabei werden Mikroskopisch, Kühlgehäuse und Kammer gleichzeitig in die gewünschte Richtung gebracht. Durch kontinuierliches Anheben des Trichters mitsamt dem Zuführschlauch und Zurückdrehen der Kammerachse in die waagrechte Lage gelangt die Suspension nach dem Prinzip von kommunizierenden Röhren in die Kammer und das übrige Meßsystem. Für jede Füllung werden etwa 4 ml Flüssigkeit benötigt. Vorhandene Luftblasen werden herausgedrückt und das System durch den Zweiwegehahn geschlossen.

Die stationäre Ebene, die man nach der Formel von Komagata berechnet, muß bei jeder Messung neu eingestellt werden, da sich durch die Kippmanipulationen das Objektiv

leicht verschiebt; außerdem kann sich die Kammer durch den nicht genau konstant zu haltenden Wasserdruck leicht verschieben. Bei der neuen Zeisschen Ausführung ist das Nachstellen der stationären Ebene nicht mehr nötig, da das Objektiv nicht mehr in das Kühlgehäuse eingebaut ist (Abb. 9).

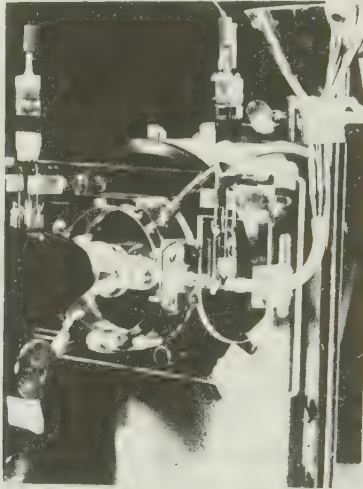


Abb. 9: Aufsicht auf das Zellelektrophoresesystem
(Copyright Labor Dr. Derlath).

Die Gelatine der Elektroden muß jede Woche erneuert werden, da sie dann Austrocknungserscheinungen zeigt und einen höheren Widerstand bietet. Die Gipsplombe wird erneuert, sobald sie stark Cu-durchlässig ist.

Nach Anlegen des elektrischen Feldes können die Zellen in der "Hin- und Her-Technik" gemessen werden, d.h. man bestimmt die Zeit, die eine Zelle braucht, um eine genau bestimmte Gitterstrecke hin- und nach Umpolen zurückzulau-
fen. Aus dieser Geschwindigkeitsangabe läßt sich dann die

elektrophoretische Beweglichkeit errechnen.

Die Erythrozyten geben mit ihrer in diesen Versuchen praktisch gleichbleibenden Geschwindigkeit die Möglichkeit festzustellen, ob das System in Ordnung ist. Von den weißen Blutzellen werden möglichst alle, die klar konturiert in das Blickfeld eintreten, gemessen, um eine subjektive Auswahl zu vermeiden. Für ein Hämozytopherogramm werden jeweils etwa 20 Zellen und 10 Erythrozyten gemessen, die durchschnittliche Meßdauer beträgt 15 Min. Diese Zeit gewährleistet, daß nicht zuviele Zellen sedimentiert sind und keine Übererwärmung des Kühlwassers eintritt. Die zusätzliche Erwärmung ergibt Störströmungen; eine Zunahme um 1°C zieht eine Beweglichkeitszunahme der Zellen von 2 % nach sich (42).

Nach der Messung wird die Suspension mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Kammer wieder gereinigt.

D) Der biologische Test

Für die Röntgenbestrahlungsversuche wählten wir folgende Arbeitsbedingungen: 300 kV, 10 mA, 0,9 mm Cu- und 1 mm Al-Filter, Abstand der Tiere von der Strahlenquelle 50 cm, Dosisleistung 1 R/sec.

Nachdem wir festgestellt hatten, daß die Fraktion elektrophoretisch schneller Leukozyten im Hämozytopherogramm nicht nur nach Bestrahlung der Ratten und Beimpfung mit Ascites (33) erscheint, sondern auch dann in konstanter Form auftritt, **wenn man splenektomierten Ratten ein Milzhomogenat i.v. gespritzt hat**, nahmen wir das Auftreten dieser Zellen im peripheren Blut als Test für die Wirksamkeit der nachfolgend beschriebenen Lipopolysaccharide und der Milzhomogenataufbereitungen. Solange die Präpa-

rate noch wasserlöslich, d.h. wie sich später ergab, noch sehr unrein waren, arbeiteten wir mit Tieren, die einen Tag vorher splenektomiert worden waren. Den 6-8 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten wurde in Äthernarkose der zu testende Stoff, gelöst in 2 ml einer mit Natriumbicarbonat auf pH 6,8 eingestellten 0,9%igen Kochsalzlösung, in eine oberflächliche Unterschenkelvene gespritzt und der 2 cm lange Fellschnitt wieder vernäht. Nach 2-3 Stunden wurde das Blut zur Präparation entnommen. Von den Gesamtleukozyten waren jeweils etwa 30 % elektrophoretisch schnelle Leukozyten gegenüber etwa 3-5 %, die im normalen Hämozytopherogramm vorkommen (Abb. 10a). Längere Einwirkungszeit der Milzhomogenataufarbeitungen änderte diese Verteilung nicht.

Bei den angereicherten Fraktionen der Milzaufarbeitung und bei den Lipopolysacchariden stellten wir fest, daß die Stoffe auch bei milzlosen Tieren wirksam sind, auch wenn man sie i. p. spritzt. Die i. v. Applikation wurde aber beibehalten, um die Bedingungen gleich zu halten.

Die schwer wasserlöslichen reinen Lipidproben wurden zunächst in 0,1 ml Äthanol gelöst, auf 1 ml mit der oben angegebenen Kochsalzlösung verdünnt und so gespritzt; bei den letzten Versuchen vereinfachten wir die Applikationsart weiter, indem wir nur die unverdünnte Äthanolösung mit einer Tuberkulinspritze injizierten. - Das Hämozytopherogramm der Testtiere in seiner typischen Form, d.h. wenn von 20 gemessenen Leukozyten mindestens 5-6 schnelle Leukozyten waren, wurde als positives Testergebnis (Abb. 10d) gewertet. Jeder Test wurde mindestens 4 x wiederholt.

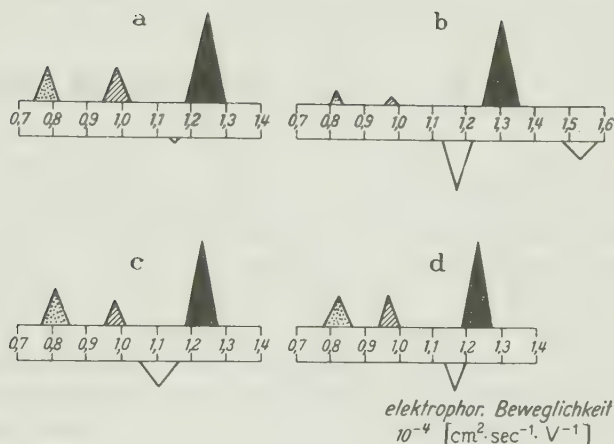


Abb. 10a-d: Cytopherogramme von Ratten. Die einzelnen Dreiecke stellen die Fraktionen der Zellelektrophorese dar, wobei die Basen der Dreiecke die mittleren Streuungen der Wanderungsgeschwindigkeit und die Höhen das Zahlenverhältnis der bei dieser Messung untersuchten Zellen wiedergeben.
a Hämycytopherogramm der gesunden Ratte, b Cytopherogramm des Knochenmarks der gesunden Ratte, c Hämycytopherogramm der Ratte nach selektiver Milzbestrahlung mit 800 R, d Hämycytopherogramm der splenektomierten Ratte nach intravenöser Injektion von 0,01 µg der wirksamen Fraktion.
▲ Granulozyten; ▲ Lymphozyten;
▲ Erythrozyten; △ elektrophoretisch schnelle Leukozyten.

IV Versuche zum Vorkommen der Fraktion elektrophoretisch schnell beweglicher Leukozyten

1) Auftreten von elektrophoretisch schnellen Leukozyten nach Injektion von Lipopolysacchariden.

Es ist bekannt, daß im peripheren Blut kurz nach der Injektion von Bakterienextrakten elektrophoretisch schnelle Leukozyten auftreten (44,45). Deshalb prüften wir verschiedene derartige Extrakte in unserem Test.

a) Versuche mit Pyrifer

Ratten, die einen Tag vorher splenektomiert worden waren, erhielten Injektionen von Pyrifer, das aus apathogenen *E. coli* gewonnen wird (Asta-Werke, Brackwede/Westf., Serie A 004 und A 007). Wir führten die Injektion in Form einer Verdünnungsreihe mit 50, 25, 10, 1 und 0,1 I.E. in je 1 ml 0,9% Kochsalzlösung durch. Der zellelektrophoretische Test war positiv. Er zeigte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine Dosisabhängigkeit und war erst bei 0,1 I.E. negativ. Die elektrophoretisch schnellen Leukozyten verschwanden sowohl bei normalen als auch bei splenektomierten Tieren erst am 4. Tag aus dem Blut. Kontrolltiere, denen in gleichen Konzentrationen 0,9% Kochsalzlösung injiziert worden war, boten ein normales Hämozytopherogramm.

b) Versuche mit Pyrexal

Pyrexal (Fa. Dr.A. Wander GmbH., Osthofen/Rhld.) ist ein Lipopolysaccharid aus *Salmonella abortus equi*. Auch dieser Test fiel positiv aus. Hier war es möglich, eine Angabe über die noch wirksamen Dosen in Gewichtsgrößen und nicht in Einheiten zu bekommen: erst 0,1 µg in 1 ml 0,9% Kochsalzlösung ergaben ein normales Hämozytopherogramm.

c) Versuche mit einem Lipopolysaccharid aus E. coli O 111

Injiziert wurde ein Präparat aus dem Stamm O 111₃₁₁₆ S₄ (Dr.A.Wander Forschungsinstitut GmbH, Freiburg/Brsg.). Die Herstellung der Lösung erfolgte nach einer Vorschrift, wie sie von Brittinger und anderen (46) bei Untersuchungen zur Blutkörperchensenkung verwendet worden war. Der elektrophoretische Test war in gleicher Weise positiv.

2) Veränderungen im Hämozytopherogramm beim Ascitestumor

Weitere veränderte Hämozytopherogramme bei der Ratte fanden wir bei Versuchen mit den Rattenhepatomzellen nach Zajdela (47). Normale und splenektomierte Ratten bekamen 1 ml Ascitesflüssigkeit des Ratenhepatoms subcutan unter die Rückenhaut gespritzt. Das Blut der Tiere wurde vom 3. Tag nach Injektion untersucht; der Tumor ist von diesem Zeitpunkt an tastbar. Er ist zunächst kirschkerngroß und gut vaskularisiert, am 8. Tag ist er ziemlich verkäst. Um diesen Zeitpunkt sterben die Tiere. Vom 3. bis 8. Tag des Tumorstadiums ergab das Blut von normalen und splenektomierten Tieren einen positiven elektrophoretischen Test, die Gesamtleukozytenzahl zeigte immer normale Werte um 9000 Zellen/mm³ Blut.

3) Einfluß der Milz auf die Vermehrung der elektrophoretisch schnellen Leukozyten

a) Zellelektrophoretisches Ergebnis nach Ganzkörperbestrahlung:

Ratten wurde in Äthernarkose die Milz unterbunden. Die Milzunterbindung allein zeigte im Hämozytopherogramm keine Wirkung. Am Tage nach der Unterbindung bekamen die Tiere eine Röntgenganzkörperbestrahlung von 800 R. Das Blut wurde 1-6 Stdn. nach Bestrahlung getestet, jeder Wert wurde bei mindestens 4 Tieren kontrolliert. Das Hämozytopherogramm war wie nach Splenektomie und einer Bestrahlung mit 800 R unverändert (49) (Abb. 10a)

In einem weiteren Versuch wurden Ratten 3 mg Neosalvarsan i.p. gespritzt, um sie vor einer Bartonelleninfektion zu schützen. 2 bzw. 3 Wochen nach der Splenektomie erhielten die Tiere eine Ganzkörperbestrahlung mit 800 R. Im zellelektrophoretischen Test trat wieder der Block elektrophoretisch schneller Leukozyten auf (Abb. 10d). Kontrolltiere, die nur splenektomiert und mit Neosalvarsan gespritzt waren, hatten ein normales Hämozytopherogramm.

Beim nächsten Versuch wurde der Effekt einer Röntgenganzkörperbestrahlung bei milznormalen Tieren folgendermaßen kontrolliert: Die Injektion von Plasma normaler Tiere in Testtiere zeigte in der Kontrolle nach 2 Stdn. ein negatives Ergebnis. Darauf wurden milznormale Tiere mit 800 R bestrahlt; ihnen wurde zwischen 1/2 und 48 Stdn. nach Bestrahlungsende Blut entnommen und 5 Min. bei 1880 g zentrifugiert. Das Plasma wurde 1 Stde. bei 4°C aufbewahrt. Jeweils 2 ml davon wurden getestet. Der elektrophoretische Test war positiv.

b) Zellelektrophoretisches Ergebnis nach Teilkörperbestrahlung:

Normalen Ratten wurde die Milz herausluxiert. Das Blut dieser Tiere zeigte ein normales Hämozytopherogramm. Dann erhielt die Milz eine Strahlendosis von 800 R, der übrige Körper war hierbei mit 0,5 cm dicken Bleiplatten abgedeckt. Der elektrophoretische Test des Blutes, das 1-24 Stdn. nach Bestrahlungsende entnommen wurde, fiel positiv aus (Abb. 10c). Der Block elektrophoretisch schneller Leukozyten zeigte quantitativ keine Abhängigkeit von der zeitlichen Entnahme des Blutes, ebenso änderte sich die Gesamtleukozytenzahl nicht signifikant.

Dazu wurde der Gegenversuch gemacht: Wir luxierten die Milz aus dem Bauchraum heraus, deckten sie mit 0,5 cm starken Bleiplatten ab und bestrahlten den übrigen Körper mit

800 R. Das in Zeitabständen von 1-5 Stdn. nach Bestrahlungsende entnommene und dann getestete Blut zeigte ein normales Hämozytopherogramm.

V) Versuche zur Anreicherung eines humoralen Faktors aus der Rattenmilz, der das Auftreten der Fraktion elektrophoretisch schneller Leukozyten im Blut stimuliert.

Die in Abschnitt A3 beschriebenen Strahlenbelastungsversuche ließen vermuten, daß in der normalen Rattenmilz ein Faktor vorhanden ist, der auf humoralem Wege in die Ausschwemmung von Leukozyten mit einer erhöhten Oberflächenladung eingreift. Deshalb wurden (gemeinsam mit Dr. J.G. Gostomzyk) folgende Versuche durchgeführt:

1) Herstellung eines Rohhomogenates aus der Milz (Schema I).

Homogenate aus bestrahlten Rattenmilzen erwiesen sich bei der Injektion als sehr toxisch (50). Deshalb wurden normale Milzen in einer mit Natriumbicarbonat auf pH 6,8 gepufferten 0,9% Kochsalzlösung nach Potter homogenisiert. Für 1 g Milzgewebe wurden 3 ml Lösung zugesetzt. Das Homogenat wurde 20 Min. bei 30 000 g und 4°C zentrifugiert. 2 ml des Überstandes ergaben einen positiven Test.

Als Kontrolle wurden Homogenate aus Leber, Lunge, Niere und peripherem Blut von Ratten untersucht, die sich als unwirksam erwiesen.

2) Dieser Extrakt zeigte folgende biologische Eigenschaften (48):

- a) pH-Abhängigkeit: Der Überstand war nur wirksam, wenn er in einer Lösung vorlag, die ein pH zwischen 5,5 und 7,5 hatte.
- b) Druckdialysierbarkeit: Die wirksame Fraktion wurde durch ein Filter Lsg. 60 (Membranfiltergesellschaft, Göttingen) mit 18 atü druckdialysiert. Das Filtrat war biologisch aktiv, d.h. das Molekulargewicht des wirksamen Stoffes

muß kleiner als 10 000 sein. In einer Dialyse (Visking-Comp., 18/32), bei der 12 Stdn. bei 4° gegen eine mit Bicarbonat gepufferte 0,9% Kochsalzlösung dialysiert wurde, war die Aktivität aus der Innenphase verschwunden.

c) Hitzeinaktivierbarkeit: Die Aktivität verschwand, wenn der Extrakt kurz aufgeköcht wurde.

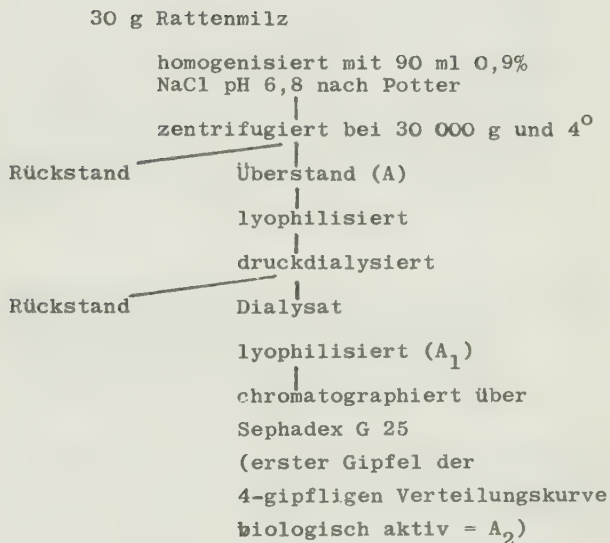
d) Auftrennbarkeit an Sephadex G 25: Das lyophilisierte Druckdialysat A₁ ließ sich über Sephadex G 25 (100-270 mesh) weiter auftrennen. Die Säule hatte eine Höhe von 83 cm und einen Durchmesser von 25 mm. Es wurden jeweils 100 mg lyophilisierte Substanz in 5 ml einer 0,9% Kochsalzlösung (pH 6,8) gelöst und aufgetragen. Eluiert wurde mit quartzbidestilliertem Wasser, welches mit n/10 Natronlauge auf pH 6,5 eingestellt worden war. Extinktionen wurden bei 252 und 280 m μ gemessen. Dabei ergab sich eine 4-gipfelige Verteilungskurve: der 1. Gipfel enthielt die biologisch aktive Fraktion A₂ (Abb. 11). Sie ließ sich mit Ninhydrin anfärben. Im elektrophoretischen Test waren noch 0,01 mg/Ratte wirksam.

e) Mit Fraktion A₂ wurden folgende Farbreaktionen vorgenommen. Für die Nachweise wurde die nichthydrolysierte Fraktion in geringer, nicht gewogener Menge eingesetzt. Nach Ninhydrinbesprühung zeigte sich eine Anfärbbarkeit, nicht dagegen nach Behandlung mit Bial-Reagenz, Anisaldehyd, Ehrlich-Aldehydreagenz und Anilin/Phthalsäure.

f) Verhalten der Fraktion A₂ gegen Fermente: Da das Molekulargewicht und die Ninhydrinanfärbbarkeit auf ein Peptid hindeuteten, untersuchten wir die Wirkung verschiedener Peptidasen und Esterasen auf die über Sephadex G 25 aufgetrennte Fraktion A₂. Wir führten folgende Inkubationsansätze durch:

g) 15 mg der Fraktion wurden in 2 ml Sörensen-Phosphat-Puffer mit einem pH von 6,8 mit 250 μ g Pronase bei 37° während 4 und 6 Stdn. inkubiert.

Schema I



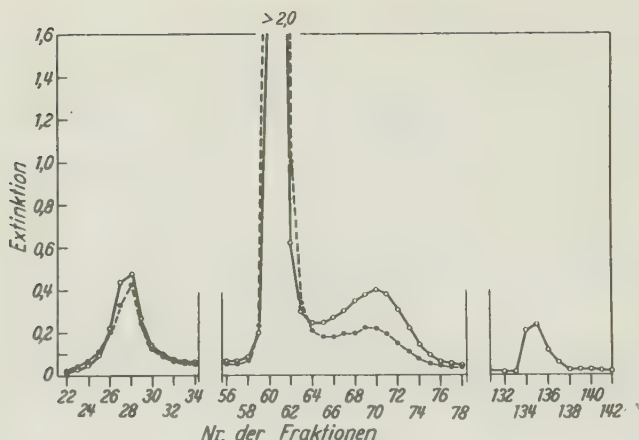


Abb. 11: Auftrennung des Druckdialysates eines wasserlöslichen Rattenmilzextraktes über Sephadex G 25. Gemessen wurden die Extinktionen im Zeiss-Photometer bei 252 (o—o) und 280 (o----o) mμ.

β) 15 mg der Fraktion wurden in 2 ml aq. dest., das mit 1/100 n Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt war, mit 0,5 mg Trypsin bei 37° während 2 Stdn. inkubiert.

γ) 10 mg der Fraktion wurden in 2 ml Sörensen-Phosphat-Puffer mit einem pH von 5,9 mit 250 mg Papain bei 37° während 2 Stdn. inkubiert.

Die biologische Aktivität war nach diesen drei Inkubationsansätzen verschwunden. Spätere Versuche mit Trypsin und Pankreaslipase an einer höher gereinigten Fraktion F_D (s. Schema III) verliefen gleichartig.

δ) Außerdem wurden 10 mg der Fraktion A_2 1 Stde. bei 37° mit 15 I.E./ml Neuraminidase (51) (Behringwerke A.G., Marburg/Lahn) inkubiert. Auch hier zerstörte das Ferment die Aktivität der Fraktion.

g) Speziesunspezifität: Die Fraktion A wurde außer aus Rattenmilzen auch noch aus frischen Rinder-, Schweine- und Menschenmilzen gewonnen. Die Menschenmilzen waren meist bei der Operation von Cardia-Carcinomen entfernt worden (Chir. Universitätsklinik München). Die wirksame Fraktion ließ sich auch in diesen Organen finden. Nur zeigte sich bei Rindermilzhomogenaten bei der säulen-chromatographischen Auftrennung eine andere Zusammensetzung der Komponenten: der 4. Gipfel trat nicht mehr auf (Abb. 12a,b). Die weitere Extraktion wurde nun mit Rindermilzen vorgenommen, um mehr Ausgangsmaterial einsetzen zu können.

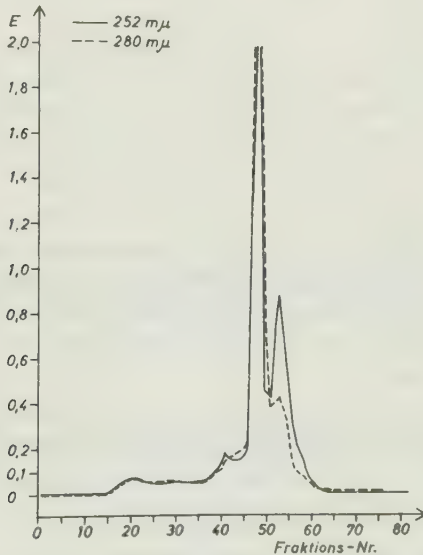


Abb. 12a: Auftrennung des Druckdialysates eines wasserlöslichen Rindermilzextraktes über Sephadex G 25. Gemessen wurden die Extinktionen im Zeiss-Photometer bei 252 (—) und 280 (----) mμ.

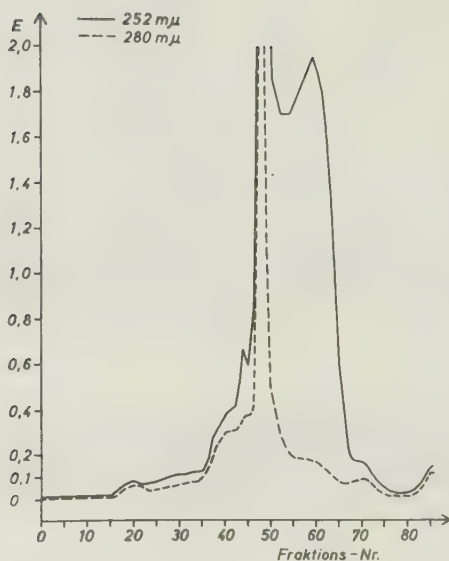


Abb. 12b: Auftrennung des Druckdialysates eines wasserlöslichen Menschenmilzextraktes über Sephadex G 25. Gemessen wurden die Extinktionen im Zeiss-Photometer bei 252 (—) und 280 (-----) mμ.

Weitere Versuche zur Reinigung des wirksamen Extraktes (Schema II)

1) Änderung der Extraktionsmethoden

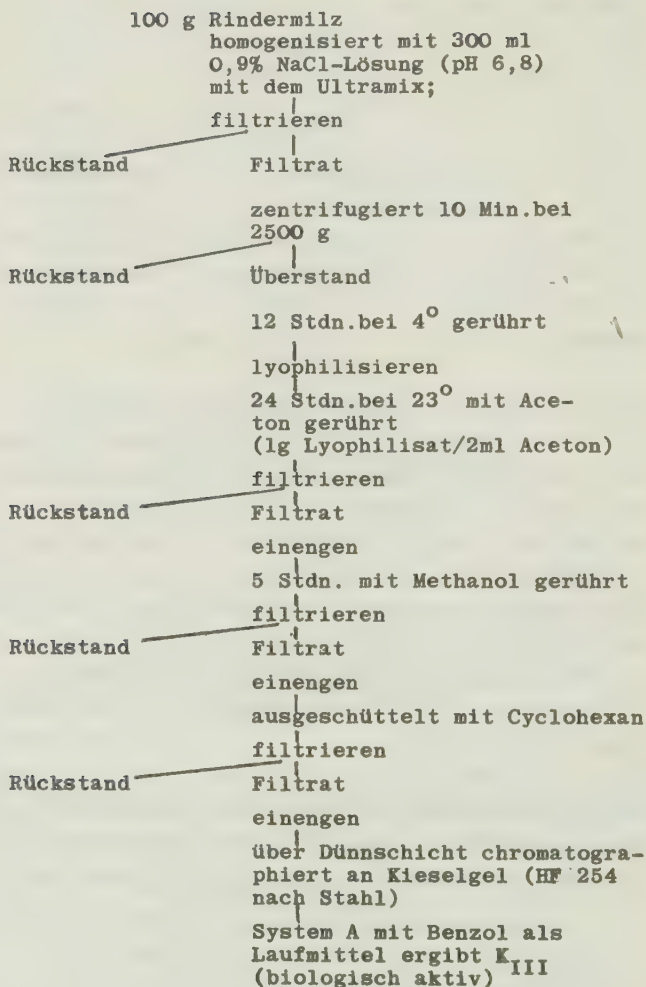
Rindermilzen wurden mit der 3-fachen Menge einer mit Bicarbonat gepufferten Kochsalzlösung bei 23° in Ultra-Mix (Fa. Braun/Melsungen) zerkleinert, bis keine großen Gewebepartikel mehr zu sehen waren. Das Homogenat wurde

über ein Porzellansieb filtriert und 10 Min. bei 2500 g zentrifugiert; der Überstand wurde 12 Stdn. bei 4° gerührt und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde 24 Stdn. mit Aceton im Verhältnis 1:2 bei 23° mit dem Magnetrührer gerührt, die feinverteilte Aufschwemmung filtriert (Filter der Fa. Schleicher und Schüll Nr. 595) und das Filtrat zu einem stark gelbbraunen Rückstand eingeeengt; Der Rückstand wurde 5 Stdn. mit Methanol im Überschuß mit dem Magnetrührer gerührt, filtriert, in eingeeengter Form nochmals kurz mit Cyclohexan ausgeschüttelt und dann über eine Fritte gegeben. Nach Einengen des Filtrates erhielten wir einen farblosen Rückstand. Die Ausbeute betrug etwa 1 mg/kg Rindermilz.

2) Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie

Die nach dieser 3-stufigen Extraktion erhaltene Fraktion wurde durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (HF 254 nach Stahl) weiter aufgetrennt. Die Platten hatten eine Größe von 20 x 20 x 0,4 cm und eine Schichtdicke von 0,5 mm. Die Dünnschicht wurde mit dem Desaga-Streichgerät aufgetragen, luftgetrocknet und 3 Stdn. bei 105° aktiviert. Die Fraktion wurde mit Aceton aufgetragen und Benzol als Laufmittel benutzt. Im ganzen zeigten sich 4 Komponenten, von denen sich nur eine Komponente K_{III} mit einem R_f von 0,5 im Test wirksam erwies. K_{III} ließ sich durch einen zweiten Lauf in Benzol nicht weiter auftrennen; es zeigte eine UV-Leuchtbande und wurde damit nachgewiesen. Die Ninhydrinanfärbbarkeit war verschwunden. K_{III} wurde mit Methanol und Cyclohexan extrahiert und

Schema II



in einer Verdünnungsreihe im elektrophoretischen Test geprüft; die Aktivität war um das 10-fache gestiegen.

Von der Fraktion K_{III} wurden außerdem UV-, IR- und KMR-Spektren angefertigt (52)⁺. Bei der weiteren Reinigung stellte sich aber heraus, daß die dabei beobachteten Banden hauptsächlich von Begleitsubstanzen herrührten.

⁺ Bei Herrn Professor H.Dannenberg, Dr.Th. Funck, Dr.W. Schäfer und Dr.J. Sonnenbichler möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Erstellung und Deutung der Spektren bedanken.

Schema III

100 g Rindermilch mit 100 ml 0,9% NaCl-Lösung (pH 6,8)
mit dem Ultramix homogenisiert

filtriert

Rückstand

Filtrat

12 Stdn. geschüttelt mit Cyclohexan
im Verhältnis 1:1 bei 23°

10 Min. bei 2500 g zentrifugiert

mittlere und untere Phase

obere Phase (P)

abgezogen und eingeengt

über Kieselgeldünnschicht (HF 254 nach Stahl)
chromatographiert

mit Benzol
ergibt F_A

mit Benzol:Essig-
säureäthylester =
6:1 ergibt F_B

mit Cyclohexan:
Chloroform =
6:4 ergibt F_C

mit Petroläther:
Essigsäureäthyl-
ester = 6:4
ergibt F_D

Neuer Aufarbeitungsweg und Charakterisierung der aktiven Fraktion F_D (Schema III)

1) Extraktion:

Die Rindermilzen wurden mit der gleichen Menge der genannten mit Bicarbonat gepufferten Kochsalzlösung zerkleinert und das Filtrat mit Cyclohexan im Verhältnis 1:1 bei 23° während 12 Stdn. mittelstark in 10 l Glasflaschen geschüttelt. Die danach homogen aussehende Mischung ließ sich durch 10 Min. dauerndes Zentrifugieren bei 2500 g gut in 3 Phasen trennen. Die Cyclohexanphase P wurde abgezogen und daraus nach Einengung die Rohsubstanz für die Dünnschichtchromatographie gewonnen. Sie hatte öligen Charakter und sah stark gelb aus.

2) Dünnschichtchromatographie:

Fraktion P wurde in Aceton gelöst und in folgenden Laufsystemen aufgetragen:

System A mit Benzol

System B mit Benzol:Essigsäureäthylester = 6:1

System C mit Cyclohexan:Chloroform = 6:4

System D mit Petroläther:Essigsäureäthylester = 6:4

Die jeweils wirksamen Fraktionen F_{A-D} zeigten keine UV-Absorption mehr; deshalb färbten wir bei unseren Chromatogrammen jeweils einen Randstreifen mit Jod zur Kennzeichnung der Lage der Substanzen. Wir kratzten die einzelnen Fraktionen quantitativ ab, schüttelten sie mit Methylalkohol und Cyclohexan aus, filtrierten das Kieselgel ab und erhielten nach Abdampfen der Lösungsmittel farblose ölige Flüssigkeiten. Die wirksame Fraktion F_D zeigte im Rahmen der Genauigkeit des elektrophoretischen Testes die gleiche biologische Aktivität wie die frühere Fraktion K_{III}.

3) Spektren von Fraktion F_D

a) Im UV-Spektrum sind keine Maxima sichtbar; auch bei sehr hoher Einwaage zeigt sich nur noch eine Endabsorption im kurzwelligen Bereich des Spektrums.

b) Das IR-Spektrum als Film gemessen besitzt die für n-aliphatische Anteile typischen Banden um $3,4 \mu$, $6,8 \mu$ und $7,25 \mu$. Eine intensive Carbonylbande tritt bei $5,73 \mu$ auf. Im Bereich um $8,6 \mu$ treten noch intensivere Banden auf.

c) Charakteristisch für das KMR-Spektrum ist die Signalgruppe hoher Intensität bei $1,2-1,4$ ppm und ein Triplett um $0,94$ ppm. Diese Signale entsprechen langen aliphatischen Ketten. Weitere Signale treten zwischen $1,6$ und $1,4$ ppm auf, außerdem Signale um $4,2$ und $5,3$ ppm.

Die Spektren deuten darauf hin, daß der Hauptanteil der vorliegenden Fraktion F_D aus teils ungesättigten Fettsäureestern besteht.

4) Versuche zur Frage der Organspezifität des wirksamen Faktors

Rinderleber wurde analog zu F_D aufgearbeitet; der elektrophoretische Test fiel aber negativ aus.

Ein anderes Ausgangsmaterial stellten Asciteszellen dar. Wir arbeiteten sie folgendermassen auf: Aus der Ascitesflüssigkeit von je 50 3 Monate alten Ratten erhielten wir nach Waschen mit 0,9% Kochsalzlösung etwa 50ml gepackte Zellen. Diese wurden in der gleichen Menge mit Bicarbonat gepufferter Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 10 Min. mit Ultraschall bei 23° behandelt und anschliessend lyophilisiert. Die weitere Extraktion ging wie bei der Komponente K_{III} vor sich, die Auftrennung wie bei Fraktion F_D . Die analog F_D gewonnene Fraktion zeigte die gleichen Spektren und die gleiche biologische Aktivität wie F_D (53).

V. Besprechung

Bestimmte Funktionszustände einer Reihe von Zellarten sind mit einer Erhöhung der negativen Überschußladung der Membranen dieser Zellen verbunden. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die elektrophoretische Beweglichkeit von Leberzellen kontinuierlich ansteigt, wenn die Tiere, von denen die Zellen gewonnen werden, 1-3 Tage einer Teilhepatektomie unterzogen wurden. Im Laufe der nächsten 2-3 Wochen fällt die elektrophoretische Beweglichkeit wieder auf den Ausgangswert ab. Dieser Zeitraum ist durch eine starke Erhöhung der Proliferationsaktivität der Leberzellen charakterisiert. Der Anstieg der negativen Überschußladung erstreckt sich aber nicht nur auf die Zellen, die sich auf Grund der Teilhepatektomie in einer Mitose befinden, sondern betrifft sämtliche proliferationsaktiven Zellen. Dies läßt sich unter anderem mit der geringen Streuung der Mittelwerte der einzelnen Zellkollektive belegen (54). -

Auch bei fast allen bisher untersuchten Tumorzellen wurde eine höhere elektrophoretische Beweglichkeit gefunden als bei den entsprechenden Mutterzellen (55,56,57,58, 59). Bisher wurde bei Tumoren nur eine Ausnahme festgestellt (60): das Morris-Hepatom 5123 A zeigt die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie normale Leberzellen. Diese relativ benigne Zellart ist aber auch in anderer Hinsicht von den meisten Tumorzellen unterschieden, so z.B. im glykolytischen Stoffwechsel. - Die Erhöhung der negativen Überschußladung der Tumorzellen scheint nicht von der in vivo-Umwelt der Tumorzellen abzuhängen: so war z.B. die elektrophoretische Beweglichkeit von Tumorzellen eines Magen-Carcinoms identisch mit jener von Tumorzellen, die aus einem regionalen Lymphknoten stammten.

Die Ladungsdichte der Zellmembran kann auch die Differenzierung innerhalb bestimmter Zellreihen wieder spiegeln. So findet man bei Spermatozyten im Laufe ihrer Differenzierung bis zum Nebenhodenschwanzbereich eine Erhöhung der elektrophoretischen Beweglichkeit. Bei und nach der Ejakulation der Spermien kommt es jedoch wieder zu einer Verminderung dieser Größe, was durch ein Ferment des Seminalplasmas verursacht wird (61). Dagegen verläuft die Differenzierung in der Erythrozytenreihe im Knochenmark des Menschen ohne Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit: sämtliche Knochenmarksvorstufen dieser Zellreihe zeigen die gleichen Werte. Auch die Reifung der Granulozyten im Knochenmark scheint ohne Änderung der negativen Ladungsdichte der Zellmembran dieser Reihe verbunden zu sein; erst bei der Ausschleusung aus dem Knochenmark kommt es zu einer relativ schnellen Verminderung der negativen Überschußladung um 20-30 %. Ob diese Verminderung Ursache oder Wirkung der Ausschleusung ist, ist unbekannt.

Auch in den Lymphknoten konnten hinsichtlich der elektrophoretischen Beweglichkeit 2 Gruppen von Zellen gefunden werden. Die erste Gruppe besitzt etwa die gleiche Beweglichkeit wie die peripheren Lymphozyten, während die zweite Gruppe eine um etwa 20-30 % höhere Beweglichkeit aufweist. Ob es sich hier auch um einen Differenzierungsprozess oder um zwei funktionsverschiedene Zellgruppen handelt, ist nicht bekannt.

Im Blut ließen sich bei einer Reihe pathologischer Zustände Änderungen des normalen Hämozytopherogramms feststellen. So besitzen myeloische Leukämien fast keine elektrophoretisch normal beweglichen Granulozyten; dafür tritt eine Fraktion schnell beweglicher kernhaltiger Zellen auf,

deren Lage im Hämozytopherogramm etwa jener von normalen Erythrozyten entspricht. Ein analoges Ergebnis fand sich bei lymphatischen Leukämien: auch hier findet man kaum elektrophoretisch normale Lymphozyten, sondern nur einen Block schneller beweglicher Zellen im Bereich der Erythrozyten.

Auch bei einem Teil der Patienten mit einer reaktiven Entzündung findet man eine Abweichung vom normalen Hämozytopherogramm. Untersucht man solche Patienten im Anfang der entzündlichen Erkrankung, so zeigen sie zum Teil neben den 3 elektrophoretisch normalen Blocken eine Fraktion von schnell beweglichen Leukozyten, die wiederum etwa im Bereich der Erythrozyten liegen. Das Verhältnis dieser schnell beweglichen Leukozyten zu den normalen Leukozyten scheint umso größer zu sein, je akuter der Krankheitszustand ist.

Die experimentelle Analyse dieses Problems an Ratten zeigte, daß auch nach einer Röntgenganzkörperbestrahlung von Ratten elektrophoretisch schnelle Leukozyten im Blut auftreten. Auch in diesem Fall entspricht die elektrophoretische Beweglichkeit etwa jener von Erythrozyten. Während im normalen Hämozytopherogramm die Zahl solch elektrophoretisch schneller Leukozyten bei etwa 5 % liegt, steigt sie wenige Stunden nach einer Bestrahlung mit 800 R auf 90-100 % an.

Bei der Messung im Zytopherometer läßt sich schwer entscheiden, ob diese elektrophoretisch schnellen Leukozyten Granulozyten oder Lymphozyten sind; folgende Gründe sprachen ursprünglich dafür, daß es sich hierbei um "membran-unreife" Granulozyten handelt:

1) Wenige Stunden nach einer Bestrahlung mit 800 R sind im Hämozytopherogramm von Ratten keine elektrophoretisch nor-

mal beweglichen Granulozyten vorhanden, während im entsprechenden Blutaussstrich morphologisch normale Granulozyten gefunden werden. 2) Im Knochenmark der Ratten sind neben den elektrophoretisch unterscheidbaren Erythrozyten, Lymphozyten und Granulozyten 2 weitere Zellgruppen nachweisbar, bei denen es sich offenbar um die Vorstufen der Granulozyten bzw. Erythrozyten handelt. Ihre Beweglichkeit liegt etwa im Bereich der Erythrozyten und entspricht damit jener der elektrophoretisch schnellen Leukozyten im Rattenblut nach einer Ganzkörperbestrahlung (Abb. 10b). 3) Im Zytopherogramm des Rattenknochenmarks finden sich zwischen dem Block der schnellen weißen Vorstufen und dem Block der normalen Lymphozyten und Granulozyten praktisch keine Zwischenwerte. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Ausschleusung der Granulozyten aus dem Knochenmark mit einer relativ schnell erfolgenden Verminderung der negativen Überschußladung der Zellmembran verbunden ist. Analoges gilt auch für das Hämocytopherogramm der Ratte nach einer Ganzkörperbestrahlung: auch hier gibt es zwischen den Blöcken der elektrophoretisch schnellen Leukozyten und jenen der Lymphozyten und (bei niedrigen Bestrahlungsdosen) den Granulozyten praktisch keine Zwischenwerte. So lag der Schluß nahe, daß es sich bei den schnell wandernden Zellen wahrscheinlich um "membranunreife" Granulozyten handelt, die nach der Bestrahlung aus dem Knochenmark unausgereift ausgeschleust werden.

Diese Schlüsse sind allerdings indirekt und schließen nicht aus, daß bei den schnellen Leukozyten zumindest auch Lymphozyten beteiligt sind. Neue Versuche in unserem Arbeitskreis zeigen, daß dies für die Mehrzahl dieser Zellen zutrifft.

Wird die Ganzkörperbestrahlung nicht bei milznormalen sondern akut milzlosen Ratten durchgeführt, findet man im Blut keine elektrophoretisch schnellen Leukozyten. Dies

sprach dafür, daß die Milz einen Faktor enthält, der bei der Bestrahlung ins Blut gelangt und für das Auftreten dieser Zellen verantwortlich ist.

Das Auftreten elektrophoretisch schneller Leukozyten nach einer Ganzkörperbestrahlung könnte auf einer direkten Strahleneinwirkung auf das Knochenmark beruhen oder aber eine mittelbare Wirkung sein, bei der ein anderes Organ als das Knochenmark die unmittelbare Trefferwirkung erleidet und seinerseits das Knochenmark mittelbar beeinflusst. Für eine solche mittelbare Wirkung kam besonders die Milz in Frage, von der schon lange auf Grund mancher klinischer Beobachtungen vermutet wurde, daß sie in die Leukopoese eingreifen kann. Diese Annahme konnte dadurch bestätigt werden, daß sich im Blut keine elektrophoretisch schnellen Leukozyten feststellen lassen, wenn die Bestrahlung bei einem akut milzlosen Tier durchgeführt oder wenn bei der Bestrahlung die Milz ausgespart wird. Andererseits treten die elektrophoretisch schnellen Leukozyten nach einer isolierten Milzbestrahlung auf. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Milz nach einer Bestrahlung einen Stoff abgibt, der für das Auftreten der elektrophoretisch schnellen Leukozyten im Blut verantwortlich ist.

Die Versuche mit chronisch milzlosen Tieren zeigen allerdings, daß die Milz nicht das einzige Organ sein kann, das nach einer Bestrahlung elektrophoretisch schnelle Leukozyten im peripheren Blut provoziert. Wird nämlich die Bestrahlung mehrere Wochen nach einer Splenektomie durchgeführt, treten im Blut solche schnellen Leukozyten so wie bei milznormalen Tieren auf. Es ist deshalb zu vermuten, daß hier das restliche retikuloendotheliale System vikariierend jene Milzfunktion übernommen hat.

Unter dieser Voraussetzung schien der Versuch gerechtfertigt, aus der Milz Extrakte zu gewinnen, die bei der Ratte zum Auftreten elektrophoretisch schneller Leukozyten im peripheren Blut führen. Dies war umso mehr berechtigt, als die Injektion von Plasma eines ganzkörperbestrahlten Tieres in eine normale Ratte zum Auftreten der elektrophoretisch schnellen Leukozyten führte und damit gezeigt werden konnte, daß eine normale Ratte auf die Injektion eines aktiven Prinzips anspricht.

Bei unseren ersten experimentellen Versuchen verwendeten wir als Testtiere splenektomierte Ratten, da anfänglich normale Ratten nicht oder vermindert reagierten. Erst nach einem höheren Reinigungsgrad des aktiven Prinzips zeigte sich zwischen normalen und splenektomierten Ratten kein Unterschied in der Reaktion, so daß dann normale Ratten als Testtiere verwendet wurden. Die Injektion erfolgte intravenös; es stellte sich später heraus, daß auch eine intraperitoneale Injektion für die Testung der Fraktionen geeignet ist.

Bei der Aufarbeitung wurden folgende Verfahren angewendet: Zerkleinerung im Ultramix, Druckdialyse, Extraktion mit Fettlösungsmitteln, Säulenchromatographie, Dünnschichtchromatographie.

Die anfängliche Vermutung, es handle sich um ein Peptid mit einer pH-labilen Komponente oder Bindung, hat sich nicht bestätigen lassen. Die weiteren Reinigungsschritte gaben den Hinweis, daß es sich bei dem wirksamen Prinzip um ein Lipoid handeln dürfte.

Die reinsten Fraktionen, die gewonnen werden konnten, zeigten folgende Eigenschaften: 0,01 µg ergaben bei der Ratte einen elektrophoretisch positiven Test, d.h. sie pro-

vozierten das vermehrte Auftreten elektrophoretisch schneller Leukozyten. Der Prozentsatz dieser Zellen zu den Gesamtleukozyten betrug immer etwa 30 %. Eine wesentliche Vermehrung wurde auch bei hohen Injektionsdosen nicht erreicht. Die Gesamtzahl der Leukozyten war nicht erhöht; in Differenzierungsversuchen von Blutaussstrichen der Testtiere konnte keine Linksverschiebung festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu ließen sich 5 Stdn. nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R 100% elektrophoretisch schnelle Zellen im Blut finden. Worauf dieser Unterschied beruht, ist unklar. Insbesondere läßt sich vorläufig keine Erklärung dafür abgeben, daß nach der Bestrahlung offenbar auch elektrophoretisch schnelle Granulozyten auftreten, während die Injektion der aktiven Milzfraction sich vor allem auf die Lymphozyten zu beschränken scheint.

Das aktive Prinzip scheint besonders in der Milz vorzukommen, weil analoge Präparationen aus Rinderleber keine Reaktion im elektrophoretischen Test zeigten. Erwiesen ist die Speziesunspezifität, da sich eine gleich aktive Fraktion F_D aus Ratten-, Rinder-, Schweine- und Menschenmilzen gewinnen ließ.

Da der biologisch wirksame Stoff mit Fettlösungsmitteln zu extrahieren ist, dürfte es sich um ein Lipoid handeln.

Ob die in gleicher Weise hämatologisch aktive Substanz aus Asciteszellen mit Fraktion F_D identisch ist, kann nicht gesagt werden. Eine Extraktion aus Leberzellen führte zu einer Fraktion, die sich chemisch von F_D nicht unterscheiden ließ, aber im Test nicht aktiv war.

VI. Zusammenfassung

1) Es konnte festgestellt werden, daß im Hämozytopherogramm von Ratten das Auftreten elektrophoretisch schneller Leukozyten wie folgt zu beeinflussen ist:

a) die Fraktion verschwindet nach akuter Milzunterbindung und anschliessender Röntgenganzkörperbestrahlung.

b) nach einer 2-3 Wochen vorausgehender Splenektomie und nachfolgender Röntgenganzkörperbestrahlung tritt die Fraktion wieder auf; dieses Hämozytopherogramm unterscheidet sich also von jenem nach Splenektomie und unmittelbar nachfolgender Bestrahlung.

c) das Plasma röntgenganzkörperbestrahlter Tiere verursacht nach Injektion ebenfalls ein vermehrtes Auftreten elektrophoretisch schneller Leukozyten.

d) nach einer isolierten Röntgenbestrahlung der Milz tritt die Fraktion elektrophoretisch schneller Leukozyten in gleichem Maß auf wie nach einer Ganzkörperbestrahlung.

e) nach einer Röntgenbestrahlung des Körpers bleibt das Hämozytopherogramm normal, wenn die Milz mit Blei abgedeckt ist.

2) Nach einer Injektion von Lipopolysacchariden ist ein quantitativ ebenso verändertes Hämozytopherogramm wie bei den Bestrahlungsversuchen zu finden; akut milzlose Tiere reagieren gleichartig. Eine Leukozytose wurde nach der Injektion nicht beobachtet.

3) Bei Tieren mit einem subcutan wachsenden Hepatom wurde das Hämozytopherogramm vom Sichtbarwerden des Tumors bis zum Tod der Tiere verfolgt. Es zeigte wiederum einen

elektrophoretisch positiven Leukozytentest.

4) Die Vermehrung elektrophoretisch schneller Zellen im Hämozytopherogramm der Ratte hat sich als Test für die Anreicherung eines humoralen Milzfaktors bewährt. Der Test gilt als positiv, wenn die Zellen etwa 1/3 der Gesamtleukozyten ausmachen.

5) Ein biologisch aktiver Extrakt ließ sich mit Lipidlösungsmitteln aus Ratten-, Rinder- und Menschenmilzen herstellen; er ist also speziesunspezifisch. 0,01 µg von dieser Fraktion ergaben einen positiven elektrophoretischen Test.

6) Eine biologisch aktive Fraktion wurde auch aus Asciteszellen gewonnen. Ähnliche Präparationen aus Leber waren dagegen biologisch nicht aktiv.

VII. Literaturverzeichnis

1. Herrath, E.v. Bau und Funktion der normalen Milz, W.de Gruyter u.Co., Berlin 1958
2. Frank, E. Berl.klin.Wochschr. 53, 555 (1916)
3. Bock, H.E., u.B.Frenzel Klin.Wochschr. 17, 1315 (1938)
4. Weinreich, J. Med.Klin.(Munich) 58, 81 (1963)
5. Ruhenstroth-Bauer, G., u. K.H.Maier Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.Pathol. Pharmakol. 214, 464 (1952)
6. Heilmeyer, L. Rev.hématol. 9, 267 (1954)
7. Ruhenstroth-Bauer, G. Handbuch der Hämatologie II/1, S.58, Urban u.Schwarzenberg, München 1959
8. Jacobson, L.O., u.M.Doyle Erythropoiesis, Grune and Stratton, New York 1962
9. Ruhenstroth-Bauer, G. Zur Frage humoraler Milzfaktoren für die Bildung und Ausschleusung von Blutzellen, in Vorbereitung
10. Jacobson, L.O., E.K.Marks, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 70, 740
E.O.Gaston, M.Robson u.R. (1949)
E. Zirkle
11. Jacobson, L.O., E.J. Science 113, 510 (1952)
Simmons, E.K.Marks u.
J.H.Eldredge
12. Jacobson, L.O., E.K.Marks Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 91, 135
u. E.O.Gaston (1956)
13. Thom, H.-J., u. K.F. Strahlentherapie 108, 371 (1959)
Hübner
14. Cole, J.L., M.C.Fishler, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 80, 112
M.E.Ellis u. V.P.Bond (1952)

30. Fuhrmann, G.F., E. Granzer, Z. Naturforsch. 19b, 7, 613
E. Bey u. G. Ruhenstroth-Bauer (1964)
31. Rueff, F., in Hämatologie und Bluttransfusion
Bd. 3, S. 60, J. F. Lehmanns Verlag München 1964
32. Ruhenstroth-Bauer, G., Münch. med. Wschr. 103, 794 (1961)
E. Straub, P. Sachtleben u. G. F. Fuhrmann
33. Arnold, R. Dissertation Universität München
1964
34. Abramson, H. A. J. Gen. Physiol. 12, 469 (1929)
35. Abramson, H. A., L. S. Moyer Reinhold Publ. Corp., New York
u. M. H. Gorin City (1942)
36. Alexander, E. A., L. J. Sci. Instr. 25, 374 (1948)
Saggers
37. Ruhenstroth-Bauer, G., u. Klin. Wschr. 34, 9 (1956)
W. Piper
38. Brinton, Ch. C. a. M. Electrophoresis, Academic Press
Lauffer New York 1959
39. Bangham, A. D., B. A. Pethica Biochem. J. 69, 12 (1958)
a. G. V. Seaman
40. Gittens, G. J. a. A. M. Analyt. Biochem. 1, 478 (1960)
James
41. Fa. Zeiss, C. Gebrauchsanleitung zum Zytometer
42. Sachtleben, P., G. F. Fuhrmann, E. Straub u. G. Klin. Wschr. 39, 839 (1961)
Ruhenstroth-Bauer
43. Maupin, B., u. R. Chary Sang 23, S. 336 (1952); Methode
modifiziert durch H. Ehrhardt
44. Beer, A. G. Fol. haematol. 66, 222 (1942)
45. Westphal, O. Ann. Inst. Past. 98, 789 (1960)
46. Brittinger, G., F.-H. Z. Naturforsch. 17b, 9, 606
Kayser, G. Nass, u. G. (1962)
Ruhenstroth-Bauer

47. Zajdela, F. Colloque franco-sovietique,
Moscou 1962, Gauthier-Villars,
Paris, 1963
48. Gostomzyk, J.G., C.Feesser Klin.Wschr. 42, 231 (1964)
u.G.Ruhenstroth-Bauer
49. Gostomzyk, J.G., R.Arnold Schweiz.Med.Wschr. 93, Nr.42,
u.G.Ruhenstroth-Bauer 1490 (1963)
50. Fliedner, T.M., u.R. Experimentelle u. klinische
Stodtmeister Strahlenhämatologie, München
1962
51. Gottschalk, A. Sialic acids, Cambridge, Univ.
Press (1960)
52. Gostomzyk, J.G., C.Feesser Z.Naturforsch. 19b, 769 (1964)
u.G.Ruhenstroth-Bauer
53. Feesser, C., Gostomzyk, Naturwissensch. 10, 263 (1965)
J.G., u. G.Ruhenstroth-
Bauer
54. Ruhenstroth-Bauer, G., Klin.Wschr. 39, 764 (1961)
W.Kübler, G.F.Fuhrmann
u. F.Rueff
55. Ambrose, E.J., A.M.James Nature 177, 676 (1956)
u. J.H.B.Lowick
56. Purdom, C., Ambrose, E.J. Nature 181, 1586 (1958)
u. G.Klein
57. Rueff, F., u. G.F.Fuhr- Münch.med.Wschr. 105, 124 (1963)
mann
58. Vassar, Ph.S. Nature 197, 1215 (1963)
59. Forrester, J.A., Ambrose, Nature 196, 1068 (1962)
E.J. u. J.A.Macpherson
60. Ruhenstroth-Bauer, G. Jahrbuch 1964 der Max-Planck-
Gesellschaft, S. 120
61. Bedford, J.M. Nature 200, 1178 (1963)

Lebenslauf

Am 8. April 1941 wurde ich in Ludwigshafen/Rhein als erste Tochter des Studienrates Richard Feeser und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Löchner, geboren. Bis zu unserer Ausbombung im Jahre 1943 wohnten wir in Mannheim und zogen dann nach Haßloch/Pflaz. Dort besuchte ich vier Jahre die Grundschule, wurde dann 1951 am Altspr. Gymnasium in Neustadt/Weinstr. aufgenommen und machte da im Frühjahr 1960 das Abitur. Während des Sommersemesters 1960 studierte ich in Freiburg/Brsg. Medizin, die nächsten vier Semester bis zum Physikum im Sommer 1962 verbrachte ich in Mainz. Die Mainzer Zeit wurde unterbrochen durch ein Werksemester in Villigst im Sommer 1961. Seit dem Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Universität München. Von Mai 1963 bis Februar 1965 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie an meiner medizinischen Dissertation. Am 21. Dezember 1965 beendigte ich das med. Staatsexamen.

